



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 31 609 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 N 9/06
C 12 N 15/52
C 07 H 21/04
C 12 N 15/69
C 12 N 15/77
C 12 N 1/21
C 12 P 13/04
C 12 P 13/06
C 12 P 13/08
C 12 P 13/14
C 12 P 13/10

②① Aktenzeichen: 198 31 609.7
②② Anmeldetag: 14. 7. 98
④③ Offenlegungstag: 15. 4. 99

// (C12N 15/52,C12R 1:15)(C12N 1/21,C12R 1:15)(C12P 13/04,C12R 1:15)(C12P 13/06,C12R 1:15)(C12P 13/08,C12R 1:15) (C12P 13/14,C12R 1:15)(C12P 13/10,C12R 1:15)

⑥⑥ Innere Priorität:
197 43 894. 6 04. 10. 97

⑦① Anmelder:
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE

⑦④ Vertreter:
Pielken, P., Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 81479 München

⑦② Erfinder:
Peters-Wendisch, Petra, Dr., 51469 Bergisch
Gladbach, DE; Eikmanns, Bernd, Prof. Dr., 89081
Ulm, DE; Sahm, Hermann, Prof. Dr., 52428 Jülich,
DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel
- ⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, die dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.

DE 198 31 609 A 1

DE 198 31 609 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, Pyruvat-Carboxylase-Gene nach Anspruch 18 bis 23, Genstrukturen nach Anspruch 24, Vektoren nach Anspruch 25, transformierte Zellen nach Anspruch 26 bis 31 sowie Verwendungen nach Anspruch 32 bis 37.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z. B. L-Lysin wie auch L-Threonin, L-Methionin und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament oder L-Glutamat, L-Aspartat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z. B. *Corynebacterium glutamicum* und seine Verwandten ssp. *flavum* und ssp. *lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol 1991, 41: 255 bis 260) wie auch *Escherichia coli* und verwandte Bakterien eingesetzt.

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschalten der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z. B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist beispielsweise ein Verfahren beschrieben, bei dem *Corynebacterium*-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Theoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849, GB 2 152 509).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z. B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 123475/1986, EP 0 488 424).

Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese kodieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z. B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese der Dihydrodipicolinsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Isoleucinbildung erreicht (EP 0 436 886).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 03 331 145), wohingegen die Erhöhung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu erhöhter Ausscheidung von Aminosäuren der Aspartatfamilie führte (EP 0 358 940).

Während des Wachstums und speziell unter Aminosäureproduktionsbedingungen muß der Tricarbonsäure-Cyclus kontinuierlich und effektiv mit C4-Verbindungen, z. B. Oxalacetat, aufgefüllt werden, um die für die Aminosäurebiosynthese abgezogenen Zwischenprodukte zu ersetzen. Bis vor kurzem hat man angenommen, daß für diese sogenannten anaplerotischen Funktionen in *Corynebacterium* die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase verantwortlich ist (Kinoshita, Biology of industrial micro-organisms 1985: 115 bis 142, Benjamin/Cummings Publishing Company, London; Liebl, The prokaryotes II, 1991: 1157 bis 1171, Springer Verlag N.Y.; Vallino und Stephanopoulos, Biotechnol Bioeng 1993, 41: 633 bis 646). Es wurde jedoch gefunden, daß Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-negative Mutanten im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf allen getesteten Medien gleich wuchsen (Peters-Wendisch et al., FEMS Microbiology Letters 1993, 112: 269 bis 274; Gubler et al., Appl Microbiol Biotechnol 1994, 40: 857 bis 863). Dieses Ergebnis zeigte, daß die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nicht essentiell für das Wachstum ist und für die anaplerotischen Reaktionen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Des weiteren wies das oben genannte Ergebnis darauf hin, daß es in *Corynebacterium* mindestens ein anderes Enzym geben muß, das für die Synthese von Oxalacetat, das für das Wachstum benötigt wird, verantwortlich ist. Kürzlich wurde auch tatsächlich eine Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *Corynebacterium glutamicum* gefunden (Peters-Wendisch et al., Microbiology 1997, 143: 1095 bis 1103). Dieses Enzym wird effektiv durch AMP, ADP und Acetyl-Coenzym A inhibiert und in Gegenwart von Laktat als Kohlenstoffquelle in erhöhter Menge gebildet. Da davon ausgegangen werden mußte, daß dieses Enzym in erster Linie für die Auffüllung des Tricarbonsäure-Cyclus beim Wachstum verantwortlich ist, war zu erwarten, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität entweder zu keiner oder allenfalls zu einer geringfügigen Erhöhung der zur Aspartatfamilie gehörenden Aminosäuren führt. Des weiteren wurde erwartet, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität der Pyruvat-Carboxylase ebenso keine Einflüsse auf die Produktion von Aminosäuren anderer Familien haben würde.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Genexpression die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder der Glutamatfamilie erhöht wird. Es zeigte sich, daß insbesondere Stämme mit erhöhter Kopienzahl des Pyruvat-Carboxylase-Gens etwa 50% mehr Lysin, 40% mehr Threonin und 150% mehr Homoserin ins Kulturmedium ausscheiden.

Die genetische Veränderung der Pyruvat-Carboxylase zur Erhöhung der Enzymaktivität erfolgt vorzugsweise durch

Mutation des endogenen Gens. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletionen, Insertionen und/oder Nukleotidaustausche.

Die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Expression des Gens positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgenen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordneten Regulatorgens erfolgen. Des weiteren kann ggf. durch Mutation einer regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung eines Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Pyruvat-Carboxylase-Gen so beeinflusst sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Des weiteren können dem Pyruvat-Carboxylase-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Pyruvat-Carboxylase-Genexpression bewirken. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. Vektor eingebaut. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Sequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Für den Einbau des Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt wird das Gen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert und in einen Aminosäureproduzierenden Mikroorganismen-Stamm, insbesondere *Corynebacterium* oder in *Escherichia coli* oder *Serratia marcescens*, transformiert. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* oder *C. glutamicum* ssp. *flavum* oder *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum*. Nach Isolierung des Gens und der in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (vgl. z. B. Simon et al., *Bio/Technology* 1983, 1: 784 bis 791; Lückmanns et al., *Gene* 1991, 102: 93 bis 98) erfolgt die Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al., *FEBS Microbiology Letters* 1991, 65: 299 bis 304) oder Konjugation (Schäfer et al., *J Bacteriol* 1990, 172: 1663 bis 1666). Als Wirtsstämme werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäure dereguliert sind und/oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen. Weiterhin werden solche Stämme bevorzugt, die einen erhöhten Anteil an solchen Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligt sind und/oder Stämme, die einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, insbesondere an Metaboliten, die für Konkurrenzreaktionen zuständig sind; d. h. es werden solche Stämme bevorzugt, bei denen ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft. So ist insbesondere ein, gegen L-Asparaginsäure- β -Methylester (AME) resistenter corynebakterieller Mikroorganismen-Stamm mit reduzierter Citrat-Synthase-Aktivität geeignet (EP 0 551 614).

Nach Isolierung sind Pyruvat-Carboxylase-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweisen. Des weiteren sind Gene mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz erhältlich. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletionen, Insertionen und/oder Substitutionen von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die Enzymaktivität bzw. -funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist. Diese Pyruvat-Carboxylase-Gene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen ist vorzugsweise der *lac*-Promotor (*lac*⁺-Gen) vorgeschaltet, wobei diesem insbesondere regulatorische Sequenzen zugeordnet sind.

Durch Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gen sind Plasmide erhältlich, die das Gen enthalten und zur Transformation eines Aminosäureproduzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d. h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid oder Vektor.

Ausführungsbeispiel

1. Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gen aus *Corynebacterium glutamicum*

Ausgehend von konservierten Bereichen aller bisher bekannten Pyruvat-Carboxylase-(*pyc*)-Genen, von *Saccharomyces cerevisiae* (*J Biol Chem* 1988, 263: 11493-11497; *Mol Gen Genet* 1991, 229: 307-315), Mensch (*Biochim Biophys Acta* 1994, 1227: 46-52), Maus (*Proc Natl Acad Sci, USA* 1993, 90: 1766-1770), *Aedes aegypti* (EMBL-GenBank; Accession Nr. U36530) sowie von *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GenBank; Accession Nr. U00024) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech). Die Primer entsprechen den Basen 810 bis 831 und 1015 bis 1037 des *pyc*-Gen von *M. tuberculosis*. Mit diesen Primern konnte mittels PCR nach der Standardmethode von Innis et al. (PCR protocols, A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) für nicht-degenerierte, homologe Primer ein Fragment von ca. 200 bp aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032, die wie bei Lückmanns et al. (*Microbiology* 1994, 140: 1817-1828) beschrieben, isoliert wurde, amplifiziert werden. Die Größe von 200 bp entsprach der Erwartung für

pyc-Gene. Das PCR-Produkt wurde wie bei Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) beschrieben, sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur (Applied Biosystems) durchgeführt.

Ausgehend von diesem DNA-Fragment aus *C. glutamicum* wurden folgende homologe Oligonukleotide hergestellt:

pyc 1 5'- CGTCTTCATCGAAATGAAC -3'

pyc 2 5'- ACGGTGGTGATCCGGCACT -3'

Die Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zur Isolierung einer Sonde für das Gen der Pyruvat-Carboxylase (pyc) aus *C. glutamicum* verwendet. Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* und Digoxigenin-markierten Nukleotiden eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der Vorschrift des 'PCR DIG Labeling Kits' der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnte ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von ca. 200 bp entsprach. Die so hergestellte pyc-Sonde wurde dann eingesetzt, um über Southern-Blot-Hybridisierung ein DNA-Fragment in der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* zu identifizieren, auf dem das pyc-Gen lokalisiert ist. Hierzu wurden jeweils 2 bis 5 µg chromosomaler DNA von *C. glutamicum* WT mit den Restriktionsenzymen HindIII, SphI, SalI, DraI, EcoRI und BamHI geschnitten, die erhaltenen DNA-Fragmente 16 h bei 20 °C in einem 0,8% igen Agarosegel gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die in dem Agarosegel befindlichen DNA-Fragmente wurden nach einer Methode von Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) denaturiert und vakuumunterstützt mit der VacuGene Blot Apparatur von Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) aus der Gelmatrix auf eine Nylon-Membran (Nytran N13 von Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz) transferiert, immobilisiert und die Digoxigeninmarkierung mittels NBT/X-Phosphat-Umsetzung durch alkalische Phosphatase nachgewiesen. Auf diese Weise konnten folgende, mit der pyc-DNA-Sonde hybridisierende chromosomale Fragmente nachgewiesen werden: ein 17 kb HindIII-Fragment, ein 6,5 kb SalI-Fragment und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment. Das 17 kb HindIII-Fragment wurde isoliert und subkloniert. Dazu wurde eine Cosmid-Genbank aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* im Cosmid pHC79 verwendet, die das Genom von *C. glutamicum* zu 99% repräsentierte (Mol Microbiol 1992, 6: 317-326). Der *E. coli*-Stamm DH5α wurde mit dieser Genbank mittels der CaCl₂-Methode von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) transformiert und zu ca. 300 Kolonien pro I.B.-Agarplatte mit 50 µg/l Kanamycin ausplattiert (insgesamt 5000 Kolonien). Anschließend wurden die erhaltenen Transformanten auf Nytran N13-Folien übertragen und diese zur alkalischen Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA auf mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl getränktem Whatmann-Papier 5 min. inkubiert. Die darauf folgende Neutralisierung erfolgte mit 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 1,5 M NaCl. Nach Inkubation der Folien in 2 × SSC wurde die freigesetzte DNA durch UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert. Anschließend wurden die restlichen Zelltrümmer durch Schütteln in 3 × SSC, 0,1% SDS bei 50°C entfernt. Die Folien wurden in dieser Form für die Hybridisierung mit einer spezifischen pyc-Sonde, wie bei Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) beschrieben, verwendet. Es wurden 3 Transformanten identifiziert, die gegen die pyc-Sonde hybridisierten. Aus diesen Transformanten wurde die Cosmid-DNA mittels Plasmid-Präparation nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim (Meth Enzymol 1983, 100: 243-255) isoliert und anschließend über Restriktion und Southern-Blot Analyse auf das Vorhandensein des HindIII-Fragments getestet. Das Cosmid pHC79-10, das ein 40 kb Insert enthielt, trug das 17 kb HindIII-Fragment vollständig und wurde weiter analysiert. Es zeigte sich, daß auch nach Restriktion mit den Endonukleasen SalI und EcoRI die gleichen hybridisierenden Fragmente wie in der chromosomalen DNA, d. h. ein 6,5 kb SalI- und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment, erhalten wurden. Das 17 kb HindIII-Fragment wurde durch Restriktion mit HindIII aus dem Cosmid isoliert und in den *E. coli*-Vektor pUC18, der ebenfalls mit HindIII geschnitten wurde, ligiert. Es wurde eine Restriktionsanalyse des Fragments in dem resultierenden Vektor pUCpyc erstellt. Die physikalische Kartierung des Fragments ist in Fig. 1 dargestellt.

2. Sequenzierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens

In weiteren Subklonierungsschritten wurden ein 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment, das 1,35 kb EcoRI-Fragment, ein 1,6 kb EcoRI-EcoRI-StuI-Fragment sowie ein 1,6 kb ClaI-Fragment, das partiell mit dem 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment überlappte, durch Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pUCpyc isoliert. Durch Ligation wurden die Fragmente in den jeweils entsprechend restringierten Vektor pUC18 kloniert und anschließend nach Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) wie oben beschrieben sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Sequenzanalyse der Fragmente ergab ein durchgehendes offenes Leseraster von 3576 bp, das für eine Proteinsequenz von 1140 Aminosäuren kodiert. Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz mit der EMBL GenBank (Heidelberg) ergab Ähnlichkeiten zu allen bekannten Pyruvat-Carboxylasen. Die höchste Identität (62%) wurde zur putativen Pyruvat-Carboxylase aus *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) gefunden. Die Ähnlichkeit betrug, unter Berücksichtigung konservierter Aminosäureaustausche, 76%. Ein Vergleich mit den Pyruvat-Carboxylasen anderer Organismen ergab 46 bis 47% identische und 64 bis 65% ähnliche Aminosäuren (Gene 1997, 191: 47-50; J Bacteriol 1996, 178: 5960-5970; Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 1766-1770; Biochem J 1996, 316: 631-637; EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530; J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß das klonierte Fragment das Gen für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* trägt. Die Nukleotidsequenz des Gens ist unter SEQ ID No. 1 und die entsprechende Aminosäuresequenz unter SEQ ID No. 2 angegeben.

3. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens

Zur Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* wurde das Gen aus dem Plasmid pUC-

pyc als 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment in den *E. coli*-C₁ Glutamicum-Pendelvektor pLEK0 (Gene 1991, 102: 93-98) kloniert, der mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI geschnitten wurde. Mittels Klenow-Polymerase-Behandlung wurden die überhängenden Enden zu glatten Enden aufgeföhrt (EcoRI) bzw. abgedaut (PstI), und der linearisierte Vektor wurde mit dem 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment ligiert. Das erhaltene Konstrukt pLEK0pyc wurde zunächst in den Stamm *E. coli* DH5 α transformiert, die Plasmid-DNA auf den erhaltenen Transformanten isoliert und auf die Richtigkeit des Inserts durch Restriktion kontrolliert. Die DNA wurde anschließend in den Stamm SP733 durch Elektroporation eingebracht (FEMS Microbiol Lett 1989, 65: 299-304). Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Mutante des restriktionsnegativen *C. glutamicum* Stammes R127 (Dechema Biotechnology Conference 1990, 4: 323-327, Verlag Chemie), die durch chemische Mutagenese erhalten worden war und sich dadurch auszeichnet, daß sie nicht auf Minimalmedium mit Pyruvat und Lactat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). Dieser Phänotyp wird durch einen Defekt in der Pyruvat-Carboxylase hervorgerufen und konnte durch das Einbringen des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus *C. glutamicum* komplementiert werden, d. h. der Stamm, der das Plasmid pLEK0pyc trägt, war im Gegensatz zum Ausgangsstamm wieder in der Lage auf Minimalmedium mit Lactat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Damit war auch der Beweis erbracht, daß das Gen für eine funktionelle Pyruvat-Carboxylase kodiert.

Darüber hinaus wurde das Plasmid pLEK0pyc in den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 durch Elektroporation transformiert. Der resultierende Stamm WT (pLEK0pyc) wurde im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 bezüglich seiner Pyruvat-Carboxylase-Aktivität untersucht. Die Stämme wurden in Komplexmedium (Luria-Bertani, Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 0,5% Lactat und auf Minimalmedium mit 2% Lactat bzw. 4% Glukose gezüchtet, und der Pyruvat-Carboxylase-Test wurde entsprechend der Methode, wie sie bei Peters-Wendisch et al. (Microbiology 1997, 143: 1095-1103) beschrieben wurde, durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse (Tabelle 1) zeigt, daß die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität im pLEK0pyc-tragenden Stamm ca. 4-fach höher als im Ausgangsstamm war.

4. Gesteigerte Akkumulation von Lysin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum* DG52-5

Zur Untersuchung der Auswirkung der Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase in dem Lysin-Produktionsstamm DG52-5 (J Gen Microbiol 1988, 134: 3221-3229) wurde der Expressionsvektor pVWEX1 verwendet, der eine IPTG-induzierbare Expression erlaubt. In diesen Vektor wurde das pyc Gen promotorlos hinein kloniert. Dazu wurden zunächst PCR-Primer (Primer 1 = Position 112-133; Primer 2 = Position 373 bis 355 in der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1) synthetisiert und 261 bp des promotorlosen Anfangsbereichs des Pyruvat-Carboxylase-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß Primer 1 eine PstI-Schnittstelle vermittelt und Primer 2 eine BamHI-Schnittstelle. Nach der PCR wurde das erhaltene 274 bp PCR-Produkt isoliert, zu Konkatenen ligiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen PstI und BamHI geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde durch Ethanol-Fällung unkonzentriert und anschließend mit dem PstI-BamHI-geschnittenen Vektor pVWEX1 ligiert. Das erhaltene Konstrukt pVWEX1-PCR wurde durch Restriktion getestet. Der Endbereich des pyc Gens wurde durch Real-Klenow-SaII-Behandlung aus dem Vektor pLEK0pyc isoliert und in den BamHI-Klenow-SaII behandelten Vektor pVWEX1-PCR ligiert. Das erhaltene Konstrukt pVWEX1pyc wurde durch Restriktionskartierung analysiert. Eine physikalische Karte des Plasmids ist in Fig. 2 gezeigt.

Das Plasmid wurde durch Elektroporation in den *C. glutamicum* Stamm DG52-5 eingebracht. Als Kontrolle wurde der Stamm DG52-5 mit dem Vektor pVWEX1 ohne Insert transformiert und die L-Lysinausscheidung jeweils drei verschiedener Transformanten verglichen. Dazu wurden DG52-5(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DG52-5(pVWEX1pyc)3, 4 und 6 in Komplexmedium (2xTY; Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press; mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden jeweils zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µl IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Lysinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 2 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer um 50% gesteigerten Akkumulation von Lysin im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

5. Gesteigerte Akkumulation von Threonin und Homoserin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum* DM368-3

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-Bildung wurde auch die Akkumulation von Threonin im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Threoninproduktionsstamm *C. glutamicum* DM368-3 (Degussa AG) mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Threoninausscheidung von jeweils drei verschiedenen Transformanten untersucht. Dazu wurden DM368-3(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DM368-3(pVWEX1pyc)1, 2 und 3 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µl IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Threoninmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482).

Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 3 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer ca. 40% igen Steigerung der Threoninkonzentration im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Threoninbildung entscheidend zu verbessern.

Des weiteren zeigte die Aminosäurekonzentrationsbestimmung, daß überraschenderweise der Stamm mit überexprimiertem Pyruvat-Carboxylase-Gen außerdem etwa 150% mehr Homoserin ins Medium ausscheidet als der Stamm mit nicht überexprimiertem Gen. Die entsprechenden Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3 dargestellt. Sie machen deutlich, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren sowohl die Threonin- als auch die Homoserinbildung entscheidend verbessert werden kann.

Tabelle 1

Stamm	IPTG [µg/ml]	Pyruvat-Carboxylase [nmol min ⁻¹ mg Trockengewicht ⁻¹]
13032(pEK0pyc)	0	75 ± 13
ATCC 13032	0	19 ± 4
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	88 ± 13
	0	11 ± 2
DG52-5(pVWEX1)	200	5 ± 2
	0	6 ± 1
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	76 ± 10
	0	12 ± 3
DM368-3(pVWEX1)	200	10 ± 1
	0	11 ± 2

Tabelle 2

Stamm	IPTG [µg/ml]	Lysin [mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	35,4 ± 2,6
	0	23,6 ± 2,9
DG52-5(pVWEX1)	200	23,3 ± 2,9
	0	22,1 ± 4,0

Tabelle 3

Stamm	IPTG [µg/ml]	Threonin [mM]	Homoserin [mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	$10,2 \pm 0,5$	$14,4 \pm 1,2$
	0	$7,9 \pm 1,0$	$5,6 \pm 0,2$
DM368-3(pVWEX1)	200	$8,0 \pm 0,5$	$5,8 \pm 0,7$
	0	$7,5 \pm 0,8$	$6,1 \pm 1,0$

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
(B) STRASSE: Postfach 1913
(C) ORT: Juelich
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 52425

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pyruvat Carboxylase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 3728 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCAACCGTG CTTGAAGTCG TGCAGGTCAG GGGAGTGTG CCCGAAAACA TTGAGAGGAA	60
AACAAAAACC GATGTTTGAT TGGGGGAATC GGGGGTTACG ATACTAGGAC GCAGTGACTG	120
CTATCACCTT TGGCGGTCTC TTGTTGAAAG GAATAATTAC TCTAGTGTG ACTCACACAT	180
CTTCAACGCT TCCAGCATTC AAAAAGATCT TGGTAGCAAA CCGCGGCGAA ATCGCGGTCC	240
GTGCTTTCCG TGCAGCACTC GAAACCGGTG CAGCCACGGT AGCTATTTAC CCCCCTGAAG	300
ATCGGGGATC ATTCCACCGC TCTTTTGCTT CTGAAGCTGT CCGCATTGGT ACCGAAGGCT	360
CACCAGTCAA GGCGTACCTG GACATCGATG AAATTATCGG TGCAGCTAAA AAAGTTAAAG	420
CAGATGCCAT TTACCCGGGA TACGGCTTCC TGTCTGAAAA TGCCCAGCTT GCCC GCGAGT	480

DE 198 31 609 A 1

GTGCGGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCCAAGA GGTCTTGAT CTCACCGGTG	540
ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGCGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTGG GCGGAATCCA	600
CCCCGAGCAA AAACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT	660
TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTGCT TCACCTGATG	720
AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GGCGATGGCG	780
CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGCGC	840
ATCACACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCACTGCAG CGTCGTCACC	900
AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT	960
GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGTTACCA GGGCGCGGA ACCGTGGAAT	1020
TCTTGGTCEA TGAAAAGGGC AACCACGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCCAGGTTG	1080
AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG	1140
CTGCTGGTGC AACCTTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCACGGTG	1200
CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG	1260
GAACTATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC	1320
AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAAATG ACCTGCCGTG	1380
GTTCCGACTT TGAAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT	1440
CTGGTGTGTC AACCAACATT GGTTCCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT	1500
CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACCCGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG	1560
CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCCTGGATT ACTTGGCAGA TGTCACCGTG AACAAGCCTC	1620
ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGCAGCTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC	1680
TGCCACTGCC ACGCGGTTCC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCAGCC GCGTTTGCTC	1740
GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTAGTGATAC CACCTTCCGC GATGCACACC	1800
AGTCTTTGCT TGCGACCCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTG	1860
CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CCGCGCGACC TACGATGTGG	1920
CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC	1980
CGAATGTAAA CATTGAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCCGTACC	2040
CAGACTCCGT CTGCCGCGCG TTTGTTAAGG AAGCTGCCAG CTCGGCGTG GACATCTTCC	2100

DE 198 31 609 A 1

	GCATCTTCGA CGCGCTTAAC GACGTCTCCC AGATGCGTCC AGCAATCGAC GCAGTCCTGG	2160
	AGACCAACAC CGCGGTAGCC GAGGTGGCTA TGGCTTATTC TGGTGATCTC TCTGATCCAA	2220
5	ATGAAAAGCT CTACACCCTG GATTACTACC TAAAGATGGC AGAGGAGATC GTCAAGTCTG	2280
	GCGCTCACAT CTTGGCCATT AAGGATATGG CTGGTCTGCT TCGCCCAGCT GCGGTAACCA	2340
10	AGCTGGTCAC CGCACTGCGC CGTGAATTCTG ATCTGCCAGT GCACGTGCAC ACCCAGACA	2400
	CTGCGGGTGG CCAGCTGGCA ACCTACTTTG CTGCAGCTCA AGCTGGTGCA GATGCTGTTG	2460
15	ACGGTGCTTC CGCACCCTG TCTGGCACCA CCTCCCAGCC ATCCCTGTCT GCCATTGTTG	2520
	CTGCATTGCG GCACACCCGT CGCGATACCG GTTTGAGCCT CGAGGCTGTT TCTGACCTCG	2580
20	AGCCGTACTG GGAAGCAGTG CGCGGACTGT ACCTGCCATT TGAGTCTGGA ACCCCAGGCC	2640
	CAACCGGTCTG CGTCTACCGC CACGAAATCC CAGGCGGACA GTTGTCCAAC CTGCGTGCAC	2700
25	AGGCCACCGC ACTGGGCCTT GCGGATCGTT TCGAACTCAT CGAAGACAAC TACGCAGCCG	2760
	TTAATGAGAT GCTGGGACGC CCAACCAAGG TCACCCCATC CTCCAAGGTT GTTGGCGACC	2820
	TCGCACTCCA CCTCGTTGGT GCGGGTGTGG ATCCAGCAGA CTTTGCTGCC GATCCACAAA	2880
30	AGTACGACAT CCCAGACTCT GTCATCGCGT TCCTGCGCGG CGAGCTTGGT AACCTCCAG	2940
	GTGGCTGGCC AGAGCCACTG CGCACCCGCG CACTGGAAGG CCGCTCCGAA GGCAAGGCAC	3000
35	CTCTGACGGA AGTTCCTGAG GAAGAGCAGG CGCACCTCGA CGCTGATGAT TCCAAGGAAC	3060
	GTCGCAATAG CCTCAACCGC CTGCTGTTCC CGAAGCCAAC CGAAGAGTTC CTCGAGCACC	3120
40	GTCGCCGCTT CGGCAACACC TCTGCGCTGG ATGATCGTGA ATTCTTCTAC GGCCTGGTCG	3180
	AAGGCCGCGA GACTTTGATC CGCCTGCCAG ATGTGCGCAC CCCACTGCTT GTTCGCCTGG	3240
45	ATGCGATCTC TGAGCCAGAC GATAAGGGTA TCGCAATGT TGTGGCCAAC GTCAACGGCC	3300
	AGATCCGCCC AATGCGTGTG CGTGACCGCT CCGTTGAGTC TGTACCGCA ACCGCAGAAA	3360
50	AGGCAGATTC CTCCAACAAG GGCCATGTTG CTGCACCATC CGCTGGTGTG GTCACCGTGA	3420
	CTGTTGCTGA AGGTGATGAG GTCAAGGCTG GAGATGCAGT CGCAATCATC GAGGCTATGA	3480
	AGATGGAAGC AACAATCACT GCTTCTGTTG ACGGCAAAAT CGATCGCGTT GTGGTTCCTG	3540
55	CTGCAACGAA GGTGGAAGGT GGCGACTTGA TCGTCGTCGT TTCCTAAACC TTTCTGTAAA	3600
	AAGCCCCGCG TCTTCCTCAT GGAGGAGGCG GGGCTTTTTG GGCCAAGATG GGAGATGGGT	3660
60	GAGTTGGATT TGGTCTGATT CGACACTTTT AAGGGCAGAG ATTTGAAGAT GGAGACCAAG	3720

65

GCTCAAAG

3728

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1140 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu
 1 5 10 15

Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu
 20 25 30

Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly
 35 40 45

Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu
 50 55 60

Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala
 65 70 75 80

Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu
 85 90 95

Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr
 100 105 110

Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser
 115 120 125

Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu
 130 135 140

Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly
 145 150 155 160

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Arg
 165 170 175

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr
 180 185 190

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr

DE 198 31 609 A 1

	195	200	205
5	Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu 210	215	220
10	Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser 225	230	235 240
15	Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His 245	250	255
20	Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe 260	265	270
25	Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val 275	280	285
30	Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln 290	295	300
35	Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys 305	310	315 320
40	Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu 325	330	335
45	Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile 340	345	350
50	Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile 355	360	365
55	Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala 370	375	380
60	Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val 385	390	395 400
65	Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala 405	410	415
70	Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile 420	425	430
75	Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg 435	440	445
80	Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro 450	455	460
85	Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val 465	470	475 480
90	Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro		

DE 198 31 609 A I

485					490					495					
Ile	Asp	Lys	Leu	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Leu	Pro	Leu	Pro	Arg	Gly	Ser
500					505					510					
Arg	Asp	Arg	Leu	Lys	Gln	Leu	Gly	Pro	Ala	Ala	Phe	Ala	Arg	Asp	Leu
515					520					525					
Arg	Glu	Gln	Asp	Ala	Leu	Ala	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Phe	Arg	Asp	Ala
530					535					540					
His	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Thr	Arg	Val	Arg	Ser	Phe	Ala	Leu	Lys	Pro
545					550					555					
Ala	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Lys	Thr	Pro	Glu	Leu	Leu	Ser	Val	Glu
565					570					575					
Ala	Trp	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Asp	Val	Ala	Met	Arg	Phe	Leu	Phe	Glu
580					585					590					
Asp	Pro	Trp	Asp	Arg	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Met	Pro	Asn	Val
595					600					605					
Asn	Ile	Gln	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Arg	Asn	Thr	Val	Gly	Tyr	Thr	Pro
610					615					620					
Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Cys	Arg	Ala	Phe	Val	Lys	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser
625					630					635					
Gly	Val	Asp	Ile	Phe	Arg	Ile	Phe	Asp	Ala	Leu	Asn	Asp	Val	Ser	Gln
645					650					655					
Met	Arg	Pro	Ala	Ile	Asp	Ala	Val	Leu	Glu	Thr	Asn	Thr	Ala	Val	Ala
660					665					670					
Glu	Val	Ala	Met	Ala	Tyr	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys
675					680					685					
Leu	Tyr	Thr	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Met	Ala	Glu	Glu	Ile	Val	Lys
690					695					700					
Ser	Gly	Ala	His	Ile	Leu	Ala	Ile	Lys	Asp	Met	Ala	Gly	Leu	Leu	Arg
705					710					715					
Pro	Ala	Ala	Val	Thr	Lys	Leu	Val	Thr	Ala	Leu	Arg	Arg	Glu	Phe	Asp
725					730					735					
Leu	Pro	Val	His	Val	His	Thr	His	Asp	Thr	Ala	Gly	Gly	Gln	Leu	Ala
740					745					750					
Thr	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Val	Asp	Gly	Ala
755					760					765					
Ser	Ala	Pro	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Gln	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Ile

DE 198 31 609 A 1

770

775

780

Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu
785 790 795 800

Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr
805 810 815

Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg
820 825 830

His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr
835 840 845

Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala
850 855 860

Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser
865 870 875 880

Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp
885 890 895

Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser
900 905 910

Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp
915 920 925

Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys
930 935 940

Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala
945 950 955 960

Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro
965 970 975

Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr
980 985 990

Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg
995 1000 1005

Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg
1010 1015 1020

Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val
1025 1030 1035 1040

Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg Asp Arg Ser
1045 1050 1055

Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys

1060

1065

1070

Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala
1075 1080 1085

Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala
1090 1095 1100

Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp
1105 1110 1115 1120

Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile
1125 1130 1135

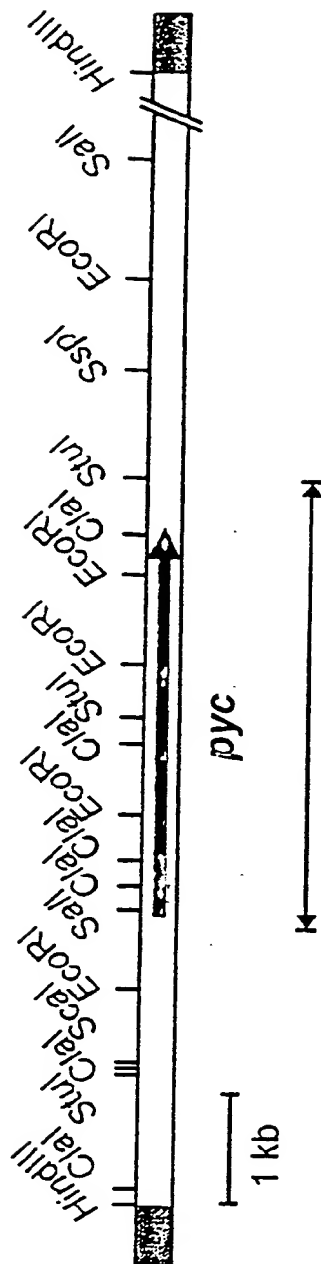
Val Val Val Ser
1140

Patentansprüche

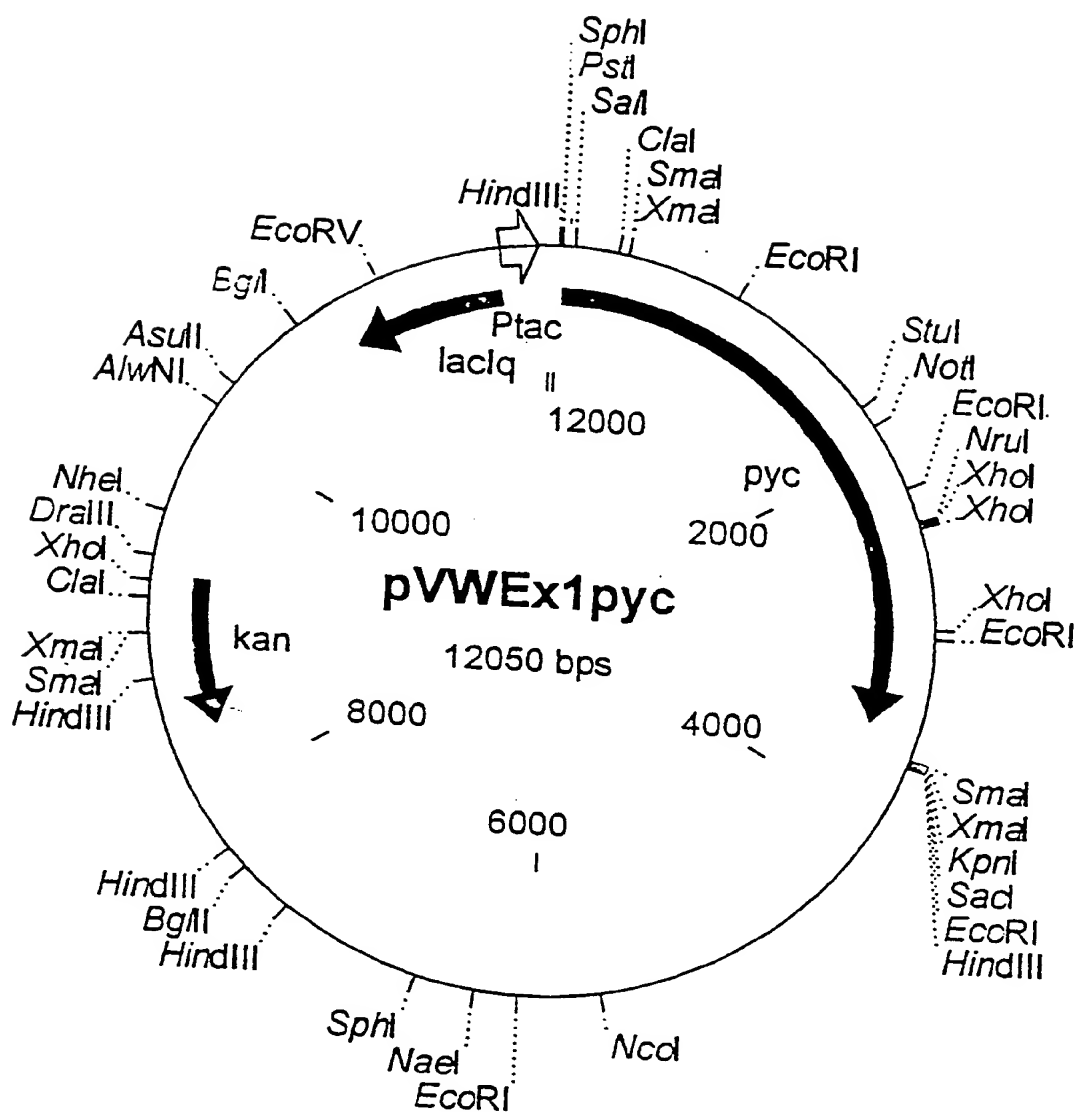
1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird 25
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch Mutation des endogenen Pyruvat-Carboxylase-Gens ein Enzym mit höherer Pyruvat-Carboxylase-Aktivität erzeugt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Genexpression der Pyruvat-Carboxylase durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird. 30
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird. 35
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind und/oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen. 40
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, bei dem ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft. 45
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Pyruvat-Carboxylase-Gen aus einem Mikroorganismus-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Genexpression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht wird. 50
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß dem Pyruvat-Carboxylase-Gen der *tac*-Promotor vorgeschaltet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, gekennzeichnet durch dem *tac*-Promotor zugeordnete regulatorische Sequenzen.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird. 55
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von Lysin, Threonin, Homoserin, Glutamat und/oder Arginin. 60
18. Pyruvat-Carboxylase-Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und/oder deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
19. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz. 65
20. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.

21. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit vorgeschaltetem tac-Promotor.
22. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 21 mit dem Promotor zugeordneten regulatorischen Sequenzen.
23. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 20 mit diesem zugeordnete regulatorische Gense-
quenzen.
24. Genstruktur, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23.
25. Vektor, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur
nach Anspruch 24.
26. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprü-
che 18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.
27. Transformierte Zelle nach Anspruch 26, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 25.
28. Transformierte Zelle nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Gattung *Corynebacte-*
rium angehört.
29. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß in dieser die an der
Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme und/oder die am Export der entsprechenden Amino-
säure beteiligten Enzyme dereguliert sind.
30. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen erhöhten An-
teil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
31. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen erniedrigten
Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten
enthält.
32. Verwendung eines Pyruvat-Carboxylase-Gen zur Steigerung der Produktion von aus der Aspartat- und/oder
Glutamatfamilie stammenden Aminosäuren von Mikroorganismen.
33. Verwendung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß ein mutiertes Pyruvat-Carboxylase-Gen, das für
ein Enzym mit erhöhter Pyruvat-Carboxylase-Aktivität kodiert, verwendet wird.
34. Verwendung nach Anspruch 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß der die entsprechende Aminosäure pro-
duzierende Mikroorganismus mit einem Genkonstrukt, das ein Pyruvat-Carboxylase-Gen enthält, transformiert
wird.
35. Verwendung nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gen-
sequenzen enthält.
36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß ein Pyruvat-Carboxylase-Gen
aus *Corynebacterium* verwendet wird.
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß als Aminosäure-produzieren-
der Mikroorganismus *Corynebacterium* verwendet wird.

Hierzu 2 Seiten(n) Zeichnungen



Figur 1



Figur 2